

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ :****C12P 7/62, C08G 63/90****A1****(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/23554****(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:** 25. November 1993 (25.11.93)**(21) Internationales Aktenzeichen:** PCT/DE93/00372**(22) Internationales Anmeldedatum:** 28. April 1993 (28.04.93)**(30) Prioritätsdaten:**

P 42 15 860.5	14. Mai 1992 (14.05.92)	DE
P 42 15 861.3	14. Mai 1992 (14.05.92)	DE
P 42 15 862.1	14. Mai 1992 (14.05.92)	DE

(71) Anmelder: BUNA AG [DE/DE]; D-06258 Schkopau (DE).**(72) Erfinder:** LEHMANN, Olaf ; Hemingwaystraße 22, D-4090 Halle (DE). MAYER, Torsten ; Am Hohen Ufer 15, D-4070 Halle (DE). RAPTHEL, Inno ; Ernst-Hermann-Meyer Str. 42, D-4090 Halle (DE). RAUCH-STEIN, Klaus-Dieter ; Zur Saaleaue 53, D-4090 Halle (DE). RUNKEL, Dietmar ; Feldschlösschenweg 48, D-4200 Merseburg (DE). SCHAFFER, Jürgen ; Myrtenweg 8, D-4090 Halle (DE).**(81) Bestimmungsstaaten:** CZ, RU, SK, UA, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).**Veröffentlicht***Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.***(54) Title:** PROCESS FOR PREPARING DYE-FREE POLYHYDROXYALKANOATES**(54) Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON FARBSTOFFFREIEN POLYHYDROXYALKANOATEN**(57) Abstract**

A process is disclosed for preparing dye-free polyhydroxyalkanoates formed in the cells as storage substances during the culture of bacterial biomasses. The dried bacterial biomass is at first exposed for 10 to 120 minutes to a temperature between 80 °C and the lower limit of the polyhydroxyalkanoate melting range, and is then extracted with acetic acid; 1 to 10 parts per volume, expressed as a percentage, of an aliphatic carboxylic acid derivate, are added to the extracting agent.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von farbstofffreien Polyhydroxyalkanoaten, welche als Speicherstoffe bei der Kultivierung von Bakterienbiomassen in den Zellen gebildet werden. Die getrocknete Bakterienbiomasse wird zunächst in einem Zeitraum von 10 bis 120 Minuten einer Temperatur zwischen 80 °C und der unteren Grenze des Schmelzbereiches der Polyhydroxyalkanoate ausgesetzt und danach mit Essigsäure extrahiert, wobei dem Extraktionsmittel 1 bis 10 Volumenanteile in % eines aliphatischen Carbonsäurederivates zugesetzt werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolci	VN	Vietnam
FI	Finnland				

1 Verfahren zur Gewinnung von farbstofffreien Polyhydroxyalkanoaten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von
5 farbstofffreien Polyhydroxyalkanoaten (PHA), welche als Speicherstoffe bei der Kultivierung von Bakterienbiomassen unter definierten Bedingungen in deren Zellen synthetisiert werden.

- 10 Unter definierten Fermentationsbedingungen synthetisieren verschiedene Mikroorganismen polymere β -Hydroxyalkansäuren zum Beispiel Polyhydroxybuttersäure (PHB) oder Copolymere Polyhydroxybuttersäure/Polyhydroxyvaleriansäure sowie auch andere Polyhydroxycarbonsäuren. Daneben entstehen in den Zellen auch
15 immer Lipide und Farbstoffe, welche bei einer weiteren Verarbeitung der gewonnenen PHA als Verunreinigung störend wirken. Es sind Verfahren bekannt, bei denen Lipide und Farbstoffe durch niedere Alkohole oder Aceton (EP 15 123, EP 58 480, EP 124 309) entfernt werden. Bei einigen carotinoiden
20 Farbstoffen führen diese Lösungsverfahren nicht zur gewünschten Farbreinheit, d.h. zu einem weißen Polymeren.

Eine andere Möglichkeit wird durch das Umfällen des Polymeren mit einem PHA-Löser (DD 276 304) erreicht. Dabei ist einer-
25 seits mit einem Kettenlängenabbau zu rechnen und andererseits wird durch die Anzahl und/oder Verschiedenheit der verwendeten Lösungs- und Fällmittel eine Aufarbeitung der PHA erschwert. Es ist auch ein höherer Restgehalt an Lösungs- oder Fällmitteln in den PHA zu erwarten.

30

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die im Prozeß der Kultivierung der Mikroorganismen und der Akkumulation von PHA in den Zellen gebildeten Farbstoffe aus den PHA zu entfernen.

- 35 Bei dem Verfahren zur Gewinnung von farbstofffreien PHA aus Bakterienbiomassen unter Anwendung der Verfahrensschritte Trocknung der feuchten Bakterienbiomasse, Extraktion der PHA mit Essigsäure und Ausfällen der im Extraktionsmittel gelösten PHA wird die Aufgabe erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die
40 getrocknete Bakterienbiomasse vor der Extraktion einer zusätzlichen Temperaturbehandlung unterzogen wird. Dazu wird die getrocknete Bakterienbiomasse zwischen 10 Minuten und 120 Minuten einer Temperatur ausgesetzt, welche im Bereich zwischen 80°C und der Temperatur der unteren Grenze des
45 Schmelzbereiches der Polyhydroxyalkanoate liegt. Während

1 dieser Temperatureinwirkung wird der in der Bakterienbiomasse enthaltene Farbstoff in eine solche Form überführt, die keinen störenden Einfluß auf die weitere Verarbeitung des Polymeren mehr ausübt. Im sich daran anschließenden Extraktionsprozeß
5 werden dem Extraktionsmittel Essigsäure 1 bis 10 Volumenanteile in % eines aliphatischen Carbonsäurederivates, bezogen auf das Gesamtvolumen des Extraktionsmittels zugesetzt. Als aliphatische Carbonsäurederivate können beispielsweise Essigsäureanhydrid oder β -Butyrolacton eingesetzt werden.

10

Die Extraktion wird unter bekannten Bedingungen durchgeführt. Die sich der Extraktion anschließende Verfahrensstufe des Ausfällens der PHA aus dem Extraktionsmittel unter Anwendung bekannter Verfahrensbedingungen ergibt hellere PHA als bei
15 bekannten Verfahrensweisen. Die aliphatischen Carbonsäurederivate und der Farbstoff verbleiben im Extraktionsmittel.

Überraschenderweise wurde nach der Aufarbeitung der PHA mit dem erfindungsgemäßen Lösungsmittelgemisch aus Essigsäure und
20 Essigsäureanhydrid ein Produkt erhalten, welches einen geringeren Farbstoffanteil aufweist als ein Produkt, das mit reiner Essigsäure oder reinem Essigsäureanhydrid als Extraktionsmittel extrahiert und in üblicher Weise ausgefällt wurde. Obwohl das Extraktionsmittel Essigsäureanhydrid hinsichtlich
25 des Farbstoffgehaltes im Polymeren einen geringeren Farbstoffanteil ergibt, war nicht zu erwarten, daß der Zusatz in einer Menge zwischen 1 und 10 Vol.-% Essigsäureanhydrid zu dem Extraktionsmittel Essigsäure einen wesentlich geringeren Farbstoffanteil ergibt gegenüber einer Extraktion mit reinem
30 Essigsäureanhydrid.

Vorteilhaft bei der Verfahrensweise ist die Vermeidung des Einsatzes zusätzlicher Lösungsmittel für eine Vorextraktion der getrockneten Bakterienbiomasse, um den Farbstoffanteil vor
35 der Extraktion der PHA aus der Bakterienbiomasse zu entfernen sowie der Erhalt eines Polymeren mit ausreichend hoher Kettenlänge durch Wegfall zusätzlicher Stufen der Umfällung der PHA.

Die Erfindung wird an folgenden Beispielen näher erläutert:

1 Vergleichsbeispiel

Sprühgetrocknete Bakterienbiomasse (Helligkeit L nach HUNTER Lab = 64,5) wird in einem Verhältnis 1 : 10 bei Siedetemperatur des Extraktionsmittels Essigsäure extrahiert und wie bekannt behandelt. Die gewonnene Polyhydroxybuttersäure (PHB) wurde mit L = 75,3 vermessen.

10

1. Beispiel

Die sprühgetrocknete Bakterienbiomasse wurde vor der Extraktion im Trockenschrank einer Temperaturbehandlung unterzogen. Die untere Grenze des Schmelzbereiches der Polyhydroxybuttersäure betrug 160°C. Danach erfolgte eine Extraktion der behandelten Bakterienbiomasse im Verhältnis 1 : 10 mit Essigsäure, welcher in einem Fall 1 Vol.-% und in einem anderen Fall 10 Vol.-% Essigsäureanhydrid bezogen auf das Gesamtvolumen des Extraktionsmittels zugesetzt wurden. Es ergaben sich folgende Helligkeiten L (nach HUNTER) für die PHB:

Anteil Essigsäureanhydrid in Vol.-%		1				10			
25	zum Extraktionsmittel								
Behandlungszeit in min		10	10	120	120	10	10	120	120
30	Behandlungstemperatur in Grad C	80	160	80	160	80	160	80	160
35	Helligkeit L	91,9	92,0	92,0	92,2	92,2	92,8	92,8	93,2

Beispiel 2

40 Entsprechend dem 1. Beispiel wurde die sprühgetrocknete Bakterienbiomasse vor der Extraktion einer Temperaturbehandlung unterzogen. Dem Extraktionsmittel Essigsäure wurde jedoch β -Butyrolacton von 1 Vol.-% bzw. 10 Vol.-% bezogen auf das Gesamtvolumen des Extraktionsmittels zugesetzt. Es ergaben sich folgende Helligkeiten L (nach HUNTER) für die PHB.

- 4 -

1 Anteil β -Butyrolacton
in Vol.-% zum
Extraktionsmittel

1

10

Behandlungszeit
in min

10 10 120 120

10 10 120 120

Behandlungstemperatur
in Grad C

80 160 80 160

80 160 80 160

Helligkeit L 80,8 82,0 81,8 82,4

82,3 86,7 87,7 90,3

1 Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von farbstofffreien Polyhydroxyalkanoaten aus Bakterienbiomasse, vorzugsweise aus der
5 Bakterienbiomasse der Mikroorganismenkultur MB 126, mit den Verfahrensstufen

Trocknung der feuchten Biomasse,

- 10 Extraktion der getrockneten Biomasse mit Essigsäure und

Ausfällen der Polyhydroxyalkanoate

- 15 gekennzeichnet dadurch, daß die getrocknete Bakterienbiomasse in einem Zeitraum von 10 bis 120 Minuten einer Temperatur zwischen 80°C und der unteren Grenze des Schmelzbereiches der Polyhydroxyalkanoate ausgesetzt und das Extraktionsmittel 1 bis 10 Volumenanteile in % eines
20 aliphatischen Carbonsäurederivates, bezogen auf das Gesamtvolumen des Extraktionsmittels enthält.

2. Verfahren nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß das aliphatische Carbonsäurederivat Essigsäureanhydrid ist.
25

3. Verfahren nach Ansprch 1 gekennzeichnet dadurch, daß das aliphatische Carbonsäurederivat β -Butyrolakton ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 93/00372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ C12P 7/62, C08G 63/90

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ C12P, C08G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DD, A1, 229428 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR), 6 November 1985 (06.11.85)	1-2
X	EP, A2, 0355307 (PETROCHEMIE DANUBIA GESELLSCHAFT M.B.H.), 28 February 1990 (28.02.90), see claim 6, example 6	3
A	DE, A, 1720325 (THE BATTELLE DEVELOPMENT CORP.), 16 June 1971 (16.06.71), see the whole document	1-3



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 September 1993 (28.09.93)

Date of mailing of the international search report

14 October 1993 (14.10.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

SF 92

26/08/93

International application No.

PCT/DE 93/00372

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DD-A1-	229428	06/11/85	NONE	
EP-A2-	0355307	28/02/90	AT-B- 390068 DE-A- 3823754 JP-A- 2069187 US-A- 4968611	12/03/90 18/01/90 08/03/90 06/11/90
DE-A-	1720325	16/06/71	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC5: C12P 7/62, C08G 63/90

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC5: C12P, C08G

Recherche, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DD, A1, 229428 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR), 6 November 1985 (06.11.85)	1-2
X	EP, A2, 0355307 (PETROCHEMIE DANUBIA GESELLSCHAFT M.B.H.), 28 Februar 1990 (28.02.90), Siehe Anspruch 6, Beispiel 6	3
A	DE, A, 1720325 (THE BATTELLE DEVELOPMENT CORP.), 16 Juni 1971 (16.06.71), Insgesamt	1-3

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.

☒ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam angesehen ist

"E" Literar. Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die gegangt ist, einen Prioritätsanspruch ausdrücklich anerkennen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine gezielte Offenbarung, eine Besetzung, eine Ausnutzung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern der zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Problems oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen einer Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann anhebend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Abschließendatum des internationalen Recherchenberichts

28 September 1993

14 -10- 1993

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Bevollmächtigter Beauftragter



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentplan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. JI 451 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

MIKAEL G:SON BERGSTRAND

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
 Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören
 26/08/93

Internationales Aktenzeichen
 PCT/DE 93/00372

Im Recherchenbericht angefurtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DD-A1-	229428	06/11/85	KEINE		
EP-A2-	0355307	28/02/90	AT-B-	390068	12/03/90
			DE-A-	3823754	18/01/90
			JP-A-	2069187	08/03/90
			US-A-	4968611	06/11/90
DE-A-	1720325	16/06/71	KEINE		

